

SPHERICAL, MAGNETIC SiO₂ PARTICLES WITH AN ADJUSTABLE PARTICLE AND PORE SIZE AND AN ADJUSTABLE MAGNETIC CONTENT, METHOD FOR PRODUCING THEM AND USE OF SiO₂ PARTICLES OF THIS TYPE**Publication number:** DE10035953**Publication date:** 2002-01-31**Inventor:** FISCHER RAINER (DE); MUELLER-SCHULTE DETLEF (DE)**Applicant:** FRAUNHOFER GES FORSCHUNG (DE)**Classification:**

- international: *B01J20/28; B03C1/01; C12N15/10; G01N33/543; H01F1/00; B01J20/28; B03C1/005; C12N15/10; G01N33/543; H01F1/00; (IPC1-7): C12Q1/68; G01N33/48; B01D15/08; B01J20/28; C12Q1/68; G01N30/48; G01N33/531; H01F1/28*

- European: *B03C1/01; C12N15/10A2D; G01N33/543D4D; H01F1/00E10; Y01N12/00*

Application number: DE20001035953 20000721**Priority number(s):** DE20001035953 20000721**Also published as:**

WO0209125 (A)

Report a data error he**Abstract of DE10035953**

The invention relates to a method for producing magnetic SiO₂ particles, comprising the following steps: a) alkoxysilanes are dispersed in water, acid-catalytically hydrolyzed and condensed to form an SiO₂ hydrosol; b) a magnetic particle-sol mixture is produced by adding magnetic particles, for example usual magnetic particles, magnetic colloids and/or ferrofluids to the SiO₂ hydrosol; c) dispersing the magnetic particle-sol mixture in an organic solvent which is immiscible with water; and d) adding a base to the magnetic particle-sol mixture during or after the dispersion in the organic solvent in order to form a gel.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 35 953 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 100 35 953.1
㉑ Anmeldetag: 21. 7. 2000
㉒ Offenlegungstag: 31. 1. 2002

⑤① Int. Cl. 7:
B 01 D 15/08
B 01 J 20/28
G 01 N 30/48
G 01 N 33/531
H 01 F 1/28
C 12 Q 1/68
// C12Q 1/68, G01N
33/48

DE 100 35 953 A 1

⑦① Anmelder:
Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung e.V., 80636 München, DE

⑦④ Vertreter:
PFENNING MEINIG & PARTNER GbR, 80336
München

⑦② Erfinder:
Fischer, Rainer, Prof. Dr., 52156 Monschau, DE;
Müller-Schulte, Detlef, Dr., 52074 Aachen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Sphärische, magnetische Silica-Partikel mit einstellbarer Teilchen- und Porengröße sowie einstellbarem Magnetgehalt für die Aufreinigung von Nukleinsäuren und anderen Biomolekülen
- ⑤⑦ Sphärische magnetische Silica-Partikel mit einer Teilchengröße von 0,5-2000 µm und einstellbarer Porengröße werden mit Hilfe eines Wasser-in-Öl-Dispersions-Vernetzungsverfahrens von Silica-Solen hergestellt. Durch Mischen der Silica-Sole mit organischen Polymeren lassen sich Silica-Partikel mit veränderten physikalischen und chemischen Eigenschaften herstellen. Die Magnetpartikel lassen sich zur Nukleinsäure-Separation sowie zur Isolierung von Biomolekülen einsetzen.

DE 100 35 953 A 1

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft magnetische Silica-Partikel mit einstellbarer Poren- und Teilchengröße sowie adaptierbarem Magnetgehalt, ein Verfahren zu deren Herstellung sowie die Verwendung der Magnetpartikel im Bereich der Nukleinsäure- und Biomolekül-Separation.

[0002] Silicagele verschiedenster Provenienz sind seit langem als Chromatographie Medien bekannt, ihr Einsatz speziell für die Nukleinsäure-Aufreinigung wurde jedoch erst Anfang der 80er Jahre erkannt und in DE 32 11 309 beschrieben. Bei den dort aufgeführten Partikeln handelt es sich um reine Silicagele, die ausschließlich in der Säulenchromatographie Verwendung finden.

[0003] Silanisierter Eisenoxid Partikel für die Immobilisierung von Enzymen sind aus der US-Patentschrift 4,152,210 bekannt. Ebenfalls zum Zwecke der Enzymimmobilisierung sind in der US-Patentschrift 4,343,901 ferromagnetische Partikel, die durch eine Sol-Gel-Technik hergestellt werden, beschrieben.

[0004] In der PCT-Anmeldung EP 97/04828 werden 50–1500 nm große monodisperse Magnetpartikel beschrieben, die aus einem SiO_2 Kern bestehen, der durch Beschichten mit Eisenoxid magnetische Eigenschaften erhält. Durch anschließende Silanisierung der Eisenoxid-Schicht sind die Teilchen befähigt, Nukleinsäuren zu binden.

[0005] Magnetische Silica-Hybrid-Partikel, bestehend aus einem Polystyrol Kern, auf den Magnetit und anschließend eine Silica-Schicht aufpolymerisiert wird, sind aus PCT/US 95/12988 bekannt. Die Partikel werden für die Antikörper- und Zellseparation eingesetzt.

[0006] Mit kolloidalem SiO_2 beschichtete Eisenoxid Partikel sind in der US-Patentschrift 4,280,918 offenbart.

[0007] V. Goetz et al. (Biotechn & Bioengineering, Vol. 37, 614, 1991) beschreiben zur Enzymimmobilisierung befähigte 20–100 μm große magnetische Silicagel-Partikel, die durch elektrostatische Beschichtung von Nickel-Pulvern mit Silica-Solen erzeugt werden. In ähnlicher Weise ist von A. M. Homola und M. R. Lorenz (IEEE Transaction on Magnetics, Vol. 22, 716, 1986) ein elektrostatisches Beschichten von Silica-Partikeln auf Fe_2O_3 Teilchen für die Herstellung magnetischer Speichermedien beschrieben.

[0008] Kolloidale Metallpartikel für den Einsatz im Immunoassay werden in der Anmeldung PCT/US 97/03886 beschrieben.

[0009] Aus der US-Patentschrift 5,320,944 sind 0,2–3 μm große Magnetpartikel bekannt, die durch Beschichten eines Polymerpartikels mit Eisenoxiden magnetische Eigenschaften erhalten. Durch weitere Beschichtung der Partikel mit Silanen, Nylon oder Polystyrol können anschließend Antikörper für den Einsatz im Immunoassay an die Partikel gekoppelt werden. Die Herstellung eines optischen Sensors in Form von Glas- oder transparenten Polymerträgern, auf denen Edelmetall-Kolloide zur Verbesserung der Effektmolekülanbindung für den Einsatz im Immunoassay aufgebracht sind, gehen aus der PCT Anmeldung AT 98/00222 hervor.

[0010] Die Synthese von Kieselgelen für die Gelpermeationschromatographie, die mittels Cer(IV)-Initiierung mit Vinylmonomeren gefropft werden, um die unspezifische Proteinadsorption zu unterdrücken, ist aus PCT/EP 94/01378 bekannt.

[0011] Organosilanisierte kolloidale Silicagel-Partikel als biologische Separationsmedien sind in den US-Patentschriften 4,927,749 und 4,927,750 sowie der PCT Anmeldung US 99/00403 offenbart, wobei die Stabilität der Kolloide und Art und Weise der Silanisierung im Vordergrund stehen.

[0012] Magnetpartikel, die ein magnetisches Kernmate-

rial enthalten und mit einem anorganischen Oxid beschichtet sind, werden in EP 0343 934 offenbart.

[0013] Polymerpartikel, die mit einer weiteren, ein magnetisches Material enthaltenden Polymerschicht beschichtet sind, auf der ein dritter zur Interaktion mit Biomolekülen befähigter Polymerüberzug aufgetragen ist, sind in der PCT Anmeldung FR 97/00912 beschrieben.

[0014] 10–60 μm große Perlglanzfarbpigmente, die mit Magnetit ummantelt und zur Trennung von biologischen Gemischen vorgesehen sind, gehen aus der PCT Anmeldung DE 97/01300 hervor.

[0015] Magnetische Hybridpartikel, die aus einem Polymer bestehen, die zunächst mit einem Ferrofluid beschichtet und anschließend mit einem funktionellen Polyacrylat beschichtet werden, sind Gegenstand der US-Patentschrift 5,648,124;

[0016] Die aus dem Stand der Technik bekannten Partikel weisen in bezug auf die Abtrennung von Nukleinsäuren einige Nachteile auf zum einen sind eine Reihe von Trägermedien nicht magnetisch (US 4,927,750; DE 32 11 309; PCT/US 99/00403; PCT/EP 94/01378), so daß eine rasche Abtrennung der Partikel, wie heute bei Routineanalysen gefordert, nicht möglich ist, d. h., man ist auf säulenchromatographische Verfahren angewiesen, zum anderen weisen Magnetpartikel auf Silica- oder Polystyrol-Basis, die mit einem magnetischen Oxid beschichtet sind, eine hohe spezifische Dichte auf (PCT/EP 97/04828, US 4,152,210, EP 3211309, 5,320,944). Daraus resultiert eine unzureichende Dispergierbarkeit, die zum schnellen Absetzen der Teilchen führt. Der Einsatz dieser Teilchen in einem Immuno- oder Nukleinsäureassays, der vorwiegend in Suspension durchgeführt wird, ist dadurch nachhaltig beeinträchtigt, man ist daher auf eine zusätzliche mechanische Durchmischung angewiesen. Der entscheidende Nachteil der beschichteten Partikel besteht jedoch darin, daß die Metalloxide sowohl als Kernmaterial als auch als Beschichtungsmaterial trotz der anschließenden Silanisierung direkt mit der Analysenlösung in Kontakt kommen können. Dies stellt ein gravierendes Problem bei der Nukleinsäure-Analytik z. B. im Rahmen der Polymerase-Ketten-Reaktion ("PCR") dar, da die bei der PCR benutzten Polymerasen im Kontakt mit Eisenverbindungen deaktiviert werden können. Bei den aus dem Stand der Technik bekannten Magnetpartikeln sind darüber hinaus keine besonderen verfahrenstechnischen Maßnahmen angegeben, die zu einer gezielten Porengrößeneinstellung führen, ein Parameter, der entscheidenden Einfluß auf die Effizienz der Nukleinsäureaufreinigung hat. Die aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren zur Herstellung der Magnetpartikel sind grundsätzlich sehr aufwendig und bedürfen eines mehrstündigen Herstellungsprozesses.

[0017] Die vorliegende Erfindung hat sich zur Aufgabe gestellt, die Nachteile der bekannten Silica-Separationsmedien zu umgehen und Verfahren zur Herstellung magnetischer Partikel auf Silica-Basis zu ermöglichen, die die bisherigen arbeits- und zeitaufwendigen Beschichtungstechniken gänzlich umgehen und dazu in der Lage sind, Teilchen- und Porengrößen sowie den Magnetanteil in gezielter Weise so einzustellen, daß die Trennmedien effizienter für die Biomolekül- oder Nukleinsäureisolierung eingesetzt werden können.

[0018] Ausgangspunkt der Erfindung sind Präpolymere in Form von Silica-Hydrosolen, die mit magnetischen Kolloiden oder Magnetpartikeln vermischt werden und anschließend in heterogener Phase zu sphärischen Polymerpartikeln polykondensiert werden.

[0019] Die Herstellung der Silica-Sole geschieht nach den bekannten Sol-Gel-Verfahren durch Hydrolyse von Alkoxysilanen mit Hilfe verdünnter Mineralsäuren oder Säuren auf

organischer Basis. Als Mineralsäuren kommen Salzsäure oder Carbonsäuren wie Essigsäure, Ameisensäure oder Propionsäure zum Einsatz.

[0020] Zur Gewinnung der Silica-Sole werden die Alkoxysilane in Wasser dispergiert und durch Säurezugabe hydrolysiert. Als Alkoxysilane können Kieselsäureorthoester aliphatischer Alkohole eingesetzt werden, wobei bevorzugt Methyl-, Äthyl- oder Propylester einzeln oder als Mischungen zum Einsatz kommen. In der Folge findet eine Kondensation zu niederpolymeren SiO_2 -Hydrosolen statt, die nach und nach durch weitere Polykondensation zu mehr oder weniger viskosen Solen bzw. Gelen führen. Dieser Sol-Gel-Prozeß wird in der Regel bei tieferen Temperaturen, vorzugsweise unter Eiskühlung, durchgeführt. Um die heterogene Silan-Wasser-Phase besser zu durchmischen, wird die Reaktion in einem Ultraschallbad oder unter Zuhilfenahme einer Ultraschallsonotrode durchgeführt. Je nach Zusammensetzung reichen Beschallungszeiten von 5 bis 30 Minuten aus, wobei die Beschallungszeiten allgemein mit zunehmender Säurekonzentration abnehmen. Die vorzugsweise eingesetzten Mineralsäuren weisen durchweg eine Konzentration von 0,02 bis 1 Mol/Liter auf, wobei der Volumenanteil der Säuren im Ansatz 15–35%, vorzugsweise 20–28%, beträgt. Die Monocarbonsäuren werden als reine Säuren eingesetzt; ihr Volumenanteil beträgt 15–30%.

[0021] Die Stöchiometrie des Gels wird entscheidend von der Art und Weise der Hydrolyse und Polykondensation bestimmt. So führt die Säurekatalyse im allgemeinen zu höheren Hydrolyseraten unter verlangsamer Polykondensation, während umgekehrt die Zugabe von Basen die Polykondensation fördert.

[0022] Wie aus dem Stand der Technik allgemein bekannt ist, wird die Spezifität der Nukleinsäure-Aufreinigung entscheidend durch die Porenstruktur bestimmt, derart, daß Nukleinsäuremoleküle mit einer Molmasse >50 kDa vorzugsweise auf Separationsträgern mit einer Porengröße von >30 nm aufgetrennt werden, während für Nukleinsäuren <50 kDa Träger mit einer Porenweite von 5–30 nm besonders geeignet sind.

[0023] Beide zum Sol führenden Reaktionsmechanismen Hydrolyse und Polykondensation können dazu benutzt werden, die Porenstruktur der Gele gezielt zu verändern bzw. einzustellen. Dies läßt sich konkret dadurch erreichen, daß die Sol-Phase in Gegenwart einer definierten Säurekonzentration hergestellt wird. Unter sonst gleichen Testbedingungen führen Säurekonzentrationen von $>0,15$ Mol/Liter in der Regel zu Porenweiten von >30 nm, wohingegen eine Verringerung der Säurekonzentration auf $<0,15$ Mol/Liter mit einer Reduktion der Porengröße unterhalb 30 nm einhergeht. Die erwähnten Parametereinstellungen sind grundsätzlich mit den jeweiligen Bedingungen der nachfolgenden basenkatalysierten Polykondensation verknüpft. So lassen sich in der Regel die oben aufgeführten Porendimensionen durchweg unter Zugabe einer 1–3%igen Ammoniak-Lösungen realisieren. Die Verwendung höherkonzentrierter Basen (6–25%) führt demgegenüber unter sonst gleichen Säurekonzentrationsverhältnissen zu Porendurchmessern von <30 nm.

[0024] Neben der Hydrolyse und Polykondensation als strukturbestimmende Faktoren, konnte überraschenderweise auch gezeigt werden, daß unter Nutzung beider Reaktionsmechanismen die Viskosität der Sol-Phase zur Einstellung der Teilchengrößen herangezogen werden kann. Die Viskosität der Sole leitet sich unmittelbar aus der spezifischen Reaktionsweise der Sol-Gel-Bildung während des Alterungsprozesses ab. Im Verlaufe dieses Prozesses tritt unter Ausbildung von Oxo-Brücken Wasser und Alkohol aus dem Sol aus, der von einer parallelen Viskositätssteigerung be-

gleitet ist. Dieser Anstieg der Viskosität führt unter sonst gleichen Verfahrensbedingungen (Rührgeschwindigkeit, chemische Zusammensetzung) zu einer Partikelvergrößerung. So werden allgemein Teilchen mit einer Größe von <100 μm vorwiegend bei einer Viskosität des Sols von <40 cp und Teilchen >200 μm aus Solen mit einer Viskositäten von >40 cp gebildet.

[0025] Durch die Zusammensetzung des erfindungsgemäßen Silan-Ansatzes werden nicht nur die morphologischen Anforderungen an die Separationsmedien erfüllt, es werden auch überraschenderweise die Voraussetzungen für die Herstellung sphärischer magnetischer Silica-Partikel geschaffen. Diese sind:

- a) Mischbarkeit der Sole mit wäßrigen Magnetkolloiden oder Magnetpartikel-Suspensionen
- b) Ausbildung definierter Polymertröpfchen beim Dispergieren in geeigneten organischen Lösungsmitteln.

[0026] Sobald im ersten Herstellungsschritt die Silan-Suspension durch Hydrolyse homogenisiert ist, kann das Sol für die weitere Partikel-Herstellung verwendet werden. Ein sofortiger Einsatz der Sole ist jedoch nicht unbedingt notwendig, da die Sole, je nach Säurekonzentration und Sol-Ansatz, über mehrere Tage hinweg eine fluide Konsistenz beibehalten und sich noch nach Tagen verarbeiten lassen.

[0027] Im zweiten Verfahrensschritt erfolgt die Zumischung eines magnetischen Kolloids oder Ferrofluids zu dem Sol. "Kolloide" bzw. "Ferrofluide" umfassen definitionsgemäß alle magnetischen Nanopartikel, die entweder unter oder ohne Zugabe eines Stabilisators, Tensids oder Emulgators eine stabile wäßrig-kolloidale Dispersion bilden.

[0028] Als magnetische Nanopartikel kommen Magnetit sowie Übergangsmetalloxide, Ferrite oder sonstige nanopartikulären Verbindungen in Frage, die entweder ferro-, ferro- oder superparamagnetischer Natur sind. Die Herstellung solcher Kolloide bzw. Ferrofluide sind mannigfaltig beschrieben in: US 4,628,037; Br. 1 439 031; EP 0275 285; US 3,917,538; US 4,827,945; US 4,329,241.

[0029] Hauptkriterium für die Auswahl geeigneter Kolloide bzw. Ferrofluide stellt ihre Kompatibilität mit dem Silica-Sol dar, d. h., das Kolloid darf im Kontakt mit der Sol-Phase nicht ausflocken oder agglomerieren. Ferrofluide, die eine homogene Dispersion mit den Solen eingehen, sind solche, die entweder geladene Tenside z. B. in Form aromatischer oder aliphatischer Sulfonsäurederivate oder aliphatischer Carbonsäuren enthalten. Solche Fluide sind auch kommerziell erhältlich.

[0030] Alternativ lassen sich auch magnetische Kolloide ohne Zusatz von Tensiden, Emulgatoren oder sonstigen oberflächenaktiven Substanzen herstellen. Dazu werden die bekannten Fällungsverfahren aus Eisen(II)- und Eisen(III)-Salzlösungen, wie u. a. von Khalafalla und Reimers (Br. Patent 1 439 031), Shinkai et al. (Biocatalysis, Vol. 5, 61, 1991) oder Kondo et. al. (Appl. Microbiol. Biotechn., Vol. 41, 99, 1994) beschrieben, verwendet. Entscheidend bei der Synthese dieser Kolloide ist die sorgfältige Entfernung der Fremdionen entweder mittels der Magnetopherese oder durch Dialyse. Bei der Magnetopherese wird das Rohprodukt durch eine mit Stahlwolle dichtgepackte chromatographische Säule (bevorzugter Durchmesser 0,4–10 mm), die sich zwischen den Polen eines starken Permanent- oder Elektromagneten befindet, hindurch geleitet. Aufgrund des dadurch erzeugten Hochgradientenmagnetfeldes läuft die überschüssige Salzlösung durch die Säule ungehindert durch, während das Kolloid bzw. Ferrofluid retentiert wird. Durch mehrmaliges Waschen des retentierten Kolloids kön-

nen restliche Salze weitgehend entfernt werden. Nach Herausnahme der Säule aus dem Magnetfeld bzw. Abschalten des Magnetfeldes kann das Kolloid dann durch einfache Elution wiedergewonnen werden.

[0031] Außer der Verwendung der obigen Kolloide bzw. Ferrofluide sind grundsätzlich auch solche Magnetpartikel zur Einkapselung verwendbar, die über eine feste Polymerhülle z. B. in Form von Polyvinylacetat, Polyvinylalkohol, Dextran, Polyacrolein, Polystyrol, Albumin oder Alginat verfügen. Solche Magnetpartikel, die im allgemeinen eine Teilchengröße von 0,05 bis 3 µm aufweisen und im Bereich der Biomolekül-Aufreinigung eingesetzt werden, sind aus dem Stand der Technik bekannt: PCT/EP96/02398; 3. Appl. Polymer Sci., Vol. 50, 765, 1993; Anal. Biochem., Vol. 128, 342, 1983; US 4,654,267; J. Cell Sci., Vol. 56, 157, 1982; Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 78, 579, 1981; DE 35 08 000. Magnetpartikel dieser Art werden auch kommerziell u. a. unter der Bezeichnung Dynabeads, BioMag, Estapor, M-PVA, AGOWA, BioBeads oder SPHERO angeboten, wobei es sich z. T. um eingetragene Warenzeichen handelt.

[0032] Diese Magnetpartikel werden in analoger Weise wie die Kolloide bzw. Ferrofluide zur Herstellung der erfindungsgemäßen Silica Partikel eingesetzt.

[0033] Die Magnet-Kolloid-Sol-Mischung wird im nachfolgenden Schritt in einem organischen Lösungsmittel unter Rühren dispergiert. Als Dispergiermittel sind solche Lösungsmittel geeignet, die mit Wasser nicht-mischbar sind und entweder Emulsionen oder Dispersionen bilden. Es hat sich überraschenderweise herausgestellt, daß vor allem solche organischen Lösungsmittel zu einer stabilen Dispersion führen, die einen Verteilungskoeffizienten von >2 aufweisen. Gemäß C. Laane et al. (in "Biocatalysis in Organic Media", Laane et al. Hrsg., Elsevier, Amsterdam, pp 65, 1987) wird damit der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten in einem Standard Octanol-Wasser-Zweiphasensystem definiert. Lösemittel, die diese Eigenschaften erfüllen, sind z. B. Chloroform, Trichlorethylen, 1,1,1-Trichloräthan, Hexan, Petroläther, Toluol; Tetrachlorkohlenstoff, Heptan, Octan. Auch Mischungen der obigen Lösungsmittel, die eine Dichte von ca. 1 g/cm³ aufweisen, eignen sich gut zum Dispergieren.

[0034] Die Herstellung der Magnetpartikel ist grundsätzlich mit den oben angegebenen reinen Lösungsmitteln möglich. In bezug auf eine engere Größenverteilung der Partikel und auf ein besseres Dispergiervverhalten konnte überraschenderweise gezeigt werden, daß der organischen Phase ein oder zwei Emulgatoren bzw. Tenside zugesetzt werden können. Zusätze dieser Art sind z. B.: Polyglycerinester, Polyäthylenglykol-Castoröl-Derivate, Polyoxyäthylen-Sorbitan-Fettsäureester, Alkylphenylpolyäthylenglykol-Derivate, Blockcopolymere aus Rizinusöl-Derivaten, Propylenoxid-Äthylenoxid-Blockcopolymere, modifizierte Polyester, Polyäthylenglykol-Ätherderivate, Polyoxypropylen-Äthylen-diamin-Blockcopolymere Sorbitan-Fettsäureester, Polyäthylenglykole, Polyoxyäthylen-, Polyoxyäthylen-Alkohol-Derivate, Polyhydroxyfettsäure-Polyäthylenglykol-Blockcopolymere, Substanzen dieser Art sind im Handel u. a. unter der Handelsbezeichnung: Hypermer®, Renex®, Estol®, Pluronic®, Bumulgin®, Tetronic®, Triton®, Brij®, Lameform®, Pripol®, Arlacel®, Prisorine®, Span®, Tween®, Dehymuls® oder Synperonic® bekannt.

[0035] Die für die Herstellung der Magnetpartikel relevanten Emulgatorkonzentrationen liegen zwischen 0,1 und 15%, vorzugsweise zwischen 0,5 und 6 Vol- bzw. Gew.-%.

[0036] Zum Dispergieren lassen sich zwar grundsätzlich auch herkömmliche Pflanzenöle sowie Mischungen von Pflanzenölen mit den organischen Lösungsmitteln verwenden, es hat sich jedoch gezeigt, daß die Verwendung organi-

scher Lösungsmittel gegenüber den Ölen einige Vorteile aufweisen. Diese liegen in der niedrigen Viskosität der organischen Verbindungen gegenüber dem Öl begründet. Die niedrige Viskosität ermöglicht die Abtrennung der synthetisierten Magnetpartikel aus dem Reaktionsgemisch innerhalb weniger Sekunden mit Hilfe eines handelsüblichen Handmagneten. Dieser Abtrennschritt erfordert bei der Verwendung von Pflanzenölen dagegen bis zu einigen Stunden, gefolgt von umfangreichen Waschprozessen mit organischen Lösungsmitteln, die notwendig sind, um das Restöl von den Magnetpartikel zu entfernen. Beim vorliegenden Verfahren dagegen können die verwendeten Lösemittel in einfacher Weise durch Redestillation wiedergewonnen werden. Die Volumenverhältnisse organische Phase zu Hydrosol betragen in der Regel 8 : 1 bis 30 : 1 sowie 2 : 1 bis 4 : 1 in bezug auf das Volumenverhältnis Sol zu Magnet Kolloid. Der Gewichtsanteil des magnetischen Festkörpers im Sol-Ansatz liegt zwischen 10–55%. Die Möglichkeit der einfachen und gezielten Einstellung des Magnetanteils durch bloßes Zumischen des Magnet-Kolloids, die dieses Verfahren gegenüber dem Stand der Technik auszeichnet, eröffnet ein breites Anwendungsspektrum, das über die bloße Auftrennung von Biomolekülen und Nukleinsäuren oder die Biomolekülanalyse, wie in PCT/EP 97/04828; DE 32 11 309; US 5,320,944; US 4,927,749; US 4,927,750; PCT/US 99/00403, PCT/FR 97/00912 beschrieben, weit hinausgeht. Dies betrifft z. B. den Einsatz der Magnetpartikel als Biokatalysatoren in biotechnologischen Fermentationsprozessen, als Protein Einkapselungsmatrix, als "Stimuli-Response"-Gels oder als Adsorber in der Hämo-perfusion. Diese zusätzlichen Anwendungen ergeben sich dadurch, daß mit Hilfe der erfindungsgemäßen Verfahren und Produkte Biomoleküle wie Enzyme oder Proteine sowohl in die Sol-Gel-Matrix durch einfaches Zumischen zu dem Sol-Ansatz eingekapselt als auch über aktive Gruppen, wie unten noch erläutert wird, an den Silica-Träger kovalent gekoppelt werden können.

[0037] Zur Fixierung der magnetischen Silica-Dispersion zu definierten Magnetpartikeln wird im letzten Verfahrensschritt während des Durchmischungsvorgangs eine Base zugesetzt. Diese Basenzugabe führt innerhalb von Sekunden zu einer festen Gelbildung des Polymertröpfchens. Der Gelbildungsprozeß ist dabei um so kürzer, je höher die gewählte Basenkonzentration ist. Vorzugsweise wird als Base Ammoniak verwendet, andere Basen, wie z. B. NaOH, können grundsätzlich auch eingesetzt werden. Die Natronlauge wird in der Regel als 0,05 bis 0,1 molare Lösung, Ammoniak durchweg in Form einer 1 bis 12%igen wäßrigen Lösung verwendet. Die Volumenverhältnisse Base zu Sol liegen üblicherweise bei 1 : 2 bis 1 : 4.

[0038] Da die Gelierungsreaktion sehr rasch abläuft, erfordert der Herstellungsprozeß für die Basispartikel einschließlich der Synthese des Sols und des Ferrofluids bzw. Kolloids einen Zeitaufwand von weniger als einer Stunde. Das bedeutet gegenüber allen herkömmlichen Verfahren eine Zeitersparnis von 60 bis 90%.

[0039] Zum Durchmischen des Sol-Lösemittel-Ansatzes gibt es keinerlei besondere Beschränkungen; es können grundsätzlich die gängigen Rührgeräte verwendet werden. Für die Herstellung besonders feiner Partikel-Fractionen (<10 µm) sind handelsübliche Dispergierwerkzeuge, die nach dem Rotor-Stator-Prinzip arbeiten (z. B. Ultra-Turrax®), mit einer Umdrehungsleistung bis zu 20.000 U/min erforderlich. Zwischen Rührgeschwindigkeit und Teilchengröße besteht eine umgekehrte Proportionalität dergestalt, daß Teilchengrößen zwischen 20 und 500 µm allgemein durch Rührgeschwindigkeiten im Bereich von 800–1800 U/min erzeugt werden und Teilchen im Bereich

von 0,5–10 µm Rührgeschwindigkeiten von 5000–20.000 U/min erfordern. Der Rührvorgang dauert in der Regel 2 bis 5 Sekunden. Die erzeugten Magnetpartikel können sodann mit Hilfe eines Handmagneten aus der Suspension abgetrennt werden. Diesem Prozeß schließen sich mehrere Waschungen mit Alkohol und Wasser an. Die erhaltenen Magnetträger werden üblicherweise in Wasser aufbewahrt. Danach können die gewonnenen Silica-Partikel direkt zur Aufreinigung von Nukleinsäuren oder Proteinen gemäß den bekannten Methoden genutzt werden.

[0040] Für die Separation von Nukleinsäuren haben sich in der Praxis nicht nur Trägermedien auf reiner Silica-Basis als nützlich erwiesen, es ist auch bekannt, daß insbesondere Medien mit kationischen Gruppen (Anionenaustauscher) für die Nukleinsäure Auftrennung hervorragend geeignet sind. Träger solcher Art sind aus DE 32 11 309 und DE 37 17 209 bekannt. Dieser Trägertyp läßt sich durch chemische Umsetzung der Silica-Partikel mit Epoxy-substituierten Alkoxysilan wie z. B. 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan oder 3-Glycidyloxypropylmethyldiäthoxysilan und anschließende nukleophile Öffnung des Oxiranringes mittels tertiärer oder sekundärer Alkylamine herstellen. Auch die Synthese stark und schwach saurer Ionenaustauscher sowie von Metallchelat-Trägern ist durch Umsetzung der beschriebenen Epoxy-substituierten Silica-Partikel mit Hilfe von Carbonsäuren, Sulfiten, Thiosulfaten bzw. Amino-substituierten Carbonsäuren, z. B. Nitrilotriessigsäure oder Iminodiessigsäure, möglich.

[0041] Die chemische Modifizierung der Silica-Partikel bleibt nicht auf die Herstellung von Ionenaustauschern beschränkt. In einer besonderen Ausführungsform können die SiO₂-Träger mit substituierten Alkylalkoxysilanen der allgemeinen Formel X-(CH₂)_n-Si-(OR)₃, wobei X ein Halogen, Cyano-, NH₂- oder Mercapto-Rest, n = 1–6, vorzugsweise 3, R ein Alkyl-, Trialksilyl-Rest oder H bedeuten, umgesetzt werden. An die so modifizierten Träger lassen sich für die Separation gemäß dem Affinitätsprinzip oder für den Einsatz als Biokatalysatoren Liganden in Form von Peptiden, Proteinen oder Enzymen kovalent koppeln. Hierfür bieten sich mehrere Möglichkeiten an:

1. Protein- und andere Liganden können durch einfache Inkubation mit den Halogen-substituierten Trägern direkt gekoppelt werden.
2. Protein-Liganden lassen sich unter Verwendung von Dialdehyden mit den Aminogruppen-substituierten Magnetpartikel kovalent binden.
3. Amino-substituierte Silica-Träger werden zunächst unter Verwendung von Succinanhidrid umgesetzt und die gebildeten Carboxylgruppen anschließend z. B. mit Carbodiimiden aktiviert. An die aktivierten Gruppen können Protein-Liganden direkt gekoppelt werden.
4. Bindung von Protein- und anderer Liganden über die Oxiran-Gruppe der oben beschriebenen Epoxy-substituierten Silica-Partikel.

[0042] In analoger Weise wie die Proteine lassen sich auch Amino-funktionalisierte Nukleinsäuren jedweder Art mit Hilfe der beschriebenen Methoden an den Silica-Träger koppeln.

[0043] Ohne auf weitere detaillierte Ausführungen diese Kopplungen und Modifikationen betreffend einzugehen, die u. a. in "Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers", Häfeli et al. (Hrsg.), Plenum Press, New York, 1997, und L. C. Shriver-Lake in "Immobilized Biomolecules in Analysis", T. Cass und F. S. Ligler Hrsg., Oxford University Press, 1998, beschrieben sind, wird davon ausgegangen, daß ein Fachmann auf diesem Gebiet die speziellen Re-

aktionsmethoden hinreichend kennt und daher die Beschreibung grundsätzlich nutzen kann. Die beschriebenen Ausführungsformen sind daher in keiner Weise als limitierende Offenbarungen aufzufassen.

[0044] Neben der Möglichkeit, Magnetpartikel aus reinem Silicagel herzustellen, konnte überraschenderweise gezeigt werden, daß sich die Magnetpartikel auch durch Mischen von Silica-Solen mit synthetischen, halbsynthetischen oder natürlichen organischen Polymeren herstellen lassen. In bezug auf die veränderte Morphologie und das chemische Reaktionsverhalten gegenüber den reinen Silicagelen ergibt sich ein modifiziertes Eigenschaftsspektrum, das eine Erweiterung des Applikationsrahmens eröffnet. Dies bezieht sich im besonderen auf die Anwendung im Bereich der Aufreinigung hochmolekularer Nukleinsäuren sowie die Abtrennung von Proteinen. Durch die Polymermischung gelangt man zu Hybridpolymeren, die partiell sowohl die chemisch-physikalischen Eigenschaften der organischen Polymere als auch die der Silicagele in sich vereinen. Konkret sind diesbezüglich das Adsorptionsverhalten der Hybridpartikel gegenüber Proteinen, die mechanische Festigkeit sowie die Basenstabilität zu nennen.

[0045] Als Mischpolymere kommen weitgehend solche Polymere in Frage, die wasserlöslich und mit den Silica-Solen kompatibel sind, d. h. homogene Mischungen ohne Phasentrennung bilden können. Die erfindungsgemäßen Produkte und deren gezielte Anwendung in ausgewählten biochemischen und biotechnologischen Bereichen betreffend, sind solche Polymere bevorzugt, die sowohl eine gezielte Modifikation der morphologischen Struktur im Hinblick auf eine Oberflächenvergrößerung als auch im Hinblick auf die Porenstruktur ermöglichen.

[0046] Polymere, die als Zusätze bevorzugt in Frage kommen, sind z. B. Polyvinylalkohol, Polyacrylsäure, Polyaminosäuren, Polysaccharide, Proteine oder Polyvinylpyrrolidon. Erfindungsgemäß gelangen üblicherweise 0,5–5% wässrige Polymerlösungen zum Einsatz, die vor dem Dispergierprozeß mit den Silica-Solen vermischt werden. Der Volumenanteil der organischen Polymerlösungen in der Solphase liegt zwischen 5 und 25%. Üblicherweise werden Polymere mit einer Molmasse von 15.000 bis 250.000 eingesetzt.

[0047] Die Verwendung der vorwiegend sehr hydrophilen Polymeren bietet auch im Hinblick auf die Abtrennung von Proteinen die Möglichkeit, das bei reinen Kieselgelen stark ausgeprägte unspezifische Adsorptionsverhalten weitgehend zu unterdrücken.

[0048] Der Zusatz der organischen Polymeren zum Sol-Ansatz ändert an der oben beschriebenen Verfahrensweise zur Herstellung reiner Silica-Partikel grundsätzlich nichts.

[0049] In den nachfolgenden Beispielen werden die erfindungsgemäßen Verfahren und Produkte näher beschrieben, ohne diese zu begrenzen.

Beispiel 1

[0050] Eine Mischung aus 55 ml Tetraäthoxysilan und 15 ml 0,05 M HCl werden in einem Ultraschallbad für 25 min. unter Eiskühlung beschallt. 20 ml des Silica-Sols, das bei 20°C eine Viskosität von 36 cp aufweist, werden mit 5 ml eines Magnet-Kolloides, das gemäß der Vorschrift von Shinkai et al. (Biocatalysis, Vol. 5, 61, 1991) durch Oxidation einer 0,6 molaren Eisen(II)salz-Lösung unter Verwendung von 0,3 M Na-Nitrit hergestellt wurde, vermischt. Die erhaltene Suspension wird in 280 ml 1.1.1-Trichlorethan, in denen 0,5 Vol.-% Tween 80 und 0,8 Vol.-% Prisorine gelöst sind, eingetragen. Der Ansatz wird unter Rühren (1800 U/min) einige Sekunden dispergiert; es werden an-

schließend 10 ml 1%ige Ammoniak-Lösung zugefügt; die Dispersion wird noch 3 Sek. weitergerührt. Nach 5 Minuten werden die Magnetpartikel mittels Handmagnet aus der Suspension abgetrennt und je dreimal mit ca. 50 ml Ethanol und Wasser nachgewaschen. Es werden Magnetpartikel mit einer Teilchengröße von 20–60 µm gewonnen. Nach 12-stündiger Inkubation in Wasser werden die Partikel nochmals mehrfach mit Wasser gewaschen und anschließend mehrere Stunden im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Partikel weisen eine mittlere Porengröße von 24 nm auf. Die gewonnenen Magnetpartikel können nach den bekannten Methoden zur Aufreinigung von Nukleinsäuren verwendet werden.

Beispiel 2

[0051] Eine Mischung bestehend aus 25 ml des gemäß Beispiel 1 hergestellten Sols und 8 ml eines Magnetit-Kolloids, das entsprechend der Vorschrift von Khalafalla und Reimers (Br-Pat. 1 439 031) aus einer Eisen(III)-Bis-sen(III)salz-Lösung (Molverhältnis 2 : 1) durch Ammoniak-Fällung gewonnen wurde, werden in 300 ml Toluol, in denen je 2 Vol.-% Pripol 1009 und Tween 20 gelöst sind, mit Hilfe eines Ultra-Turrax' bei 12.000 U/min. dispergiert. Nach Zugabe von 12 ml 3%iger Ammoniak-Lösung wird noch 2 Sekunden weiter dispergiert. Es folgt die Separation und Aufarbeitung analog Beispiel 1. Es werden Magnetpartikel mit einer Teilchengröße von 1–4 µm und einem Magnetit-Gehalt von 38 Gew.-% erhalten.

Beispiel 3

[0052] Eine Suspension bestehend aus 50 ml Tetraethoxysilan und 20 ml 0,3 M HCl werden für 5 min. in einem Ultraschallbad beschallt. 20 ml des so gewonnenen Sols, das eine Viskosität von 48 cp aufweist, werden mit 8 ml des gemäß Beispiel 2 hergestellten Magnetit-Kolloids und 2 ml einer 2,5%igen Polyvinylalkohol-Lösung (Molmasse = 224.000) vermischt. Die Suspension wird anschließend unter Rühren (1600 U/min) in 320 ml Hexan, die 0,5 Vol.-% Bstol SMO 3685 gelöst enthalten, dispergiert. Während des Dispergiervorganges werden 10 ml 1%ige Ammoniaklösung zugefügt, und es wird 4 Sekunden weitergerührt. Separation und Aufarbeitung der gewonnenen Magnetpartikel erfolgt analog Beispiel 1. Es entstehen Träger mit einer Größe von 80–150 µm und einer durchschnittlichen Porengröße von 58 nm. Die abgetrennte Magnetpartikel-Fraktion wird 5-mal mit getrocknetem Toluol nach jeweiliger magnetischer Abtrennung gewaschen und anschließend 12 Std. nach Zugabe von 50 ml Toluol und 0,85 g 3-Aminopropyltriäthoxysilan am Rückfluß gekocht. Die Magnetpartikel werden wieder magnetisch abgetrennt und je 3-mal mit Toluol und Chloroform nachgewaschen. Es folgt mehrstündige Trocknung im Vakuum. Das amino-modifizierte Produkt wird anschließend mit 6%iger Glutaraldehyd-Lösung in 25 ml 0,1 M Na-Carbonat-Puffer, pH 9,2, für 3 Std. bei 35°C umgesetzt. Es wird anschließend intensiv mit 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,2, nachgewaschen. Die gewonnenen Aldehyd-funktionalisierten Magnetpartikel werden in 15 ml 0,1 M Phosphat-Puffer suspendiert. 2 ml der Suspension werden magnetisch abgetrennt und in 2 ml 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,2, in dem 1,2 mg Streptavidin gelöst sind, inkubiert. Nach 6stündiger Reaktion bei 35°C wird das Produkt fünfmal mit Phosphat-Puffer nachgewaschen. Um verbliebene Rest-Aldehydgruppen abzusättigen, wird das magnetisch abgetrennte Produkt in 5 ml 0,2 M Äthanolamin bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 5 Stunden inkubiert. Die anschließend mehrfach mit Phos-

phat-Puffer gewaschenen Magnetpartikel können direkt nach den bekannten Verfahren zur Bindung biotinylierter Nukleinsäuren oder biotinylierter Proteine verwendet werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung sphärischer, magnetischer Silica-Partikel, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein durch säure-katalytische Hydrolyse einer wässrigen Silan-Dispersion gebildetes Silica-Hydrosol, das mit einem magnetischen Kolloid oder Ferrofluid oder mit Magnetpartikeln vermischt ist, in einer mit Wasser nicht mischbaren organischen Phase dispergiert und während des Dispergiervorganges durch Zugabe einer Base vernetzt wird.
2. Verfahren zur Herstellung magnetischer Silica-Partikel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Hydrosol eine Viskosität von 5–500 cp aufweist.
3. Verfahren zur Herstellung magnetischer Silica-Partikel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die mit Wasser nicht mischbare organische Phase 0,1 bis 25 Vol.-% einer oder mehrerer oberflächenaktiven Substanz(en) gelöst enthält.
4. Verfahren zur Herstellung magnetischer Silica-Partikel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als organische Phase ein organisches Lösungsmittel mit einem Verteilungskoeffizienten >2 verwendet wird.
5. Verfahren zur Herstellung magnetischer Silica-Partikel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Volumenverhältnis Sol zu organischer Phase 1 : 5–1 : 30 beträgt.
6. Verfahren zur Herstellung magnetischer Silica-Partikel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Silan-Dispersion 15–35 Vol.-% einer 0,02 bis 1 molaren Säure enthält.
7. Verfahren zur Herstellung magnetischer Silica-Partikel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Volumenverhältnis Silica-Sol zu Magnet-Kolloid oder Ferrofluid oder Magnetpartikel 2 : 1–4 : 1 beträgt.
8. Verfahren zur Herstellung magnetischer Silica-Partikel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Dispergier-Vernetzungsvorgang 1–5 Sek. dauert.
9. Verfahren zur Herstellung magnetischer Silica-Partikel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß dem Sol vor dem Dispergiervorgang 1–30 Vol.-% einer wäßrigen Lösung eines organischen Polymeren, Polysaccharids oder Proteins zugemischt werden.
10. Verfahren zur Herstellung magnetischer Silica-Partikel gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß als organisches Polymer Polyvinylalkohol, Dextran, Stärke, Chitosan, Alginat, Ficoll, Polyäthylenimin, Polyvinylpyrrolidon, Agarose, Polyacrylsäure, Hyaluronsäure, Pectinat oder Alginat verwendet wird.
11. Verfahren zur Herstellung magnetischer Silica-Partikel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Silica-Partikel nach dem Dispersions-Vernetzungs-Prozeß mit Alkoxysilanen oder substituierten Alkylalkoxysilanen umgesetzt werden.
12. Sphärische, magnetische Silica-Partikel mit einer Teilchengröße von 0,5–2000 µm und einstellbarer Porengröße sowie einstellbarem Magnetgehalt für die Nukleinsäure- oder Biomolekül-Separation, erhältlich durch ein Dispersions-Vernetzungsverfahren eines wässrigen Silica-Sols, dadurch gekennzeichnet, daß in dem Silica-Partikel ein magnetisches Kolloid oder Ferrofluid oder Magnetpartikel homogen über das gesamte Partikel verteilt und eingekapselt ist/sind, wobei

der Magnet-Festkörperanteil 10–55 Gew.-% bezogen auf den Silica-Anteil beträgt.

13. Sphärische, magnetische Silica-Partikel gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die aus dem Silica-Sol geformten Magnetpartikel 2–25 Gew.-% eines organischen Polymeren, Polysaccharids oder Proteins enthalten. 5

14. Sphärische, magnetische Silica-Partikel gemäß Ansprüchen 12 und 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Silica-Partikel mit einem Alkoxysilan oder einem substituierten Alkylalkoxysilan der allgemeinen Formel $X-(CH_2)_n-Si-(OR)_3$, wobei X ein Halogen, Epoxy, Cyano-, NH_2 - oder Mercapto-Rest, $n = 1-6$, R ein Alkyl-, Trialkylsilyl-Rest oder H bedeuten, umgesetzt sind. 10 15

15. Sphärische, magnetische Silica-Partikel gemäß Anspruch 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Silica-Partikel mit Oligopeptiden, Oligosacchariden, Oligonukleotiden, Polypeptiden, Polynukleotiden, Polysacchariden, Antikörpern, Antikörper-Fragmenten oder Enzymen koppelnde Gruppen aufweisen. 20

16. Sphärische, magnetische Silica-Partikel gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Epoxy-substituierten Silica-Magnetpartikel mit sekundären oder tertiären Alkylaininen zu Anionenaustauschern umgesetzt sind. 25

17. Verwendung der sphärischen, magnetischen Silica-Partikel nach einem der Ansprüche 12 bis 16 für die Isolierung oder Analyse von Nukleinsäuren, Proteinen, Antikörpern, oder Antikörper-Fragmenten sowie biotinylierter Nukleinsäuren, Proteine, Antikörper oder Antikörper-Fragmente. 30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -